

結腸陰窩における細胞増殖分化の時空間ダイナミクス Spatio-temporal Dynamics of Cell Proliferation and Differentiation in Colonic Crypts

堀田 徳子(Noriko Horita)¹, 松本 慎也¹, 加川 友己², 谷口 英樹³, 常田 聡¹

¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科 (Dept. of Life Science and Medical Bio-Science, Waseda University)

² 早稲田大学ナノ理工学研究機構 (Institute for Nanoscience and Nanotechnology, Waseda University)

³ 横浜市立大学医学研究科 (Dept. of Regenerative Medicine, Yokohama City University)

【概要】

結腸がんは先進国において発生するがんの多くを占めている。これまで人体の腫瘍や動物実験、細胞培養技術などを用いて結腸がんの形成機構を解明する研究が盛んに行われている。今回我々は、これらの実験結果を正しく解釈・統合していくため、結腸がん発生部位である陰窩(図1)における細胞の増殖・分化に対する数理モデルの構築を行った。本モデルは、個々の細胞の位置・大きさ・細胞周期などを記述する Individual Based Modeling (IBM) の手法を用いており、細胞がピュレーションモデルでは表現できない、細胞配置の時空間パターンを可視化することができる。

本研究では、細胞増殖・分化に関係するモデルパラメータを様々に変化させたときの、細胞配置パターンの変化を詳しく調べ、正常な結腸陰窩で得られた実験データの再現を試みる。最終的には、現在提示されている様々な発がん機構を *in silico* で検証するシステム(シミュレータ)を、本数理モデルを基盤として構築することを目指している。シミュレータを使って実験者自らが数理モデルによる予測を行い、次の実験系に役立てることで、研究の加速化・効率化が進めば、結腸がん研究の発展につながるのではないかと考えている。

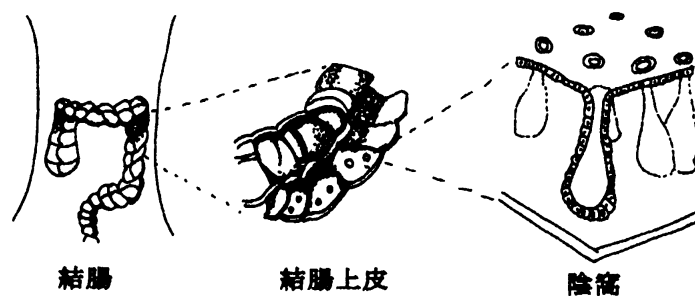


図1. 陰窩の位置

【モデル構築】

<陰窩形状のモデリング>

袋状である陰窩の上端・下端を除いた部分を円柱とみなし、これを展開した長方形(410 μ m $\times$ 820 μ m)を陰窩のモデルとした。

<細胞のモデリング>

細胞は、分裂能力をもつ分裂細胞と、分裂細胞が分化した後の成熟細胞の2種類を仮定した。それぞれの細胞は円でモデル化され、位置・半径・細胞年齢・分裂回数などからなるパラメータセットを持つ。また分裂細胞はあらかじめ決められた数の「世代」(成熟度)を経て成熟細胞に変化する。

<細胞の挙動のモデリング>

各細胞は次の4つのステージを順にめぐる。

- 1.成長…細胞周期の間に円の面積が2倍になる。
- 2.分裂…細胞周期の最後に細胞は2つに分裂する。
- 3.押し合い…重なり合った細胞同士は押し合って離れようとする。
- 4.剥離…陰窩の上端に達した細胞は剥離する。

以下に示す各細胞の挙動は、計算の前に手動で設定することができる。

- a.非対称分裂の確率:細胞分裂には、ある世代の分裂細胞が次の世代の分裂細胞を2つ生み出す対称分裂と、同じ世代と次の世代の分裂細胞を1つずつ生み出す非対称分裂がある。このうち、非対称分裂を選択する確率を設定する。
- b.成熟細胞になるまでの分裂回数:分裂細胞が分化して成熟細胞になる前に何世代(成熟度)を経験するかを設定する。
- c.アポトーシスを起こす確率:細胞分裂の前にアポトーシスを選択し、細胞死する確率を設定する。
- d.G0期に入る確率:細胞分裂の前に、G0期に入り休眠する確率を設定する。
- e.分裂軸の角度:分裂により娘細胞を生み出す方向を設定する。

【結果と考察】

・時空間パターンの可視化

細胞配置の時空間パターンの例を以下に示す。細胞の表現方法には、1個の細胞を円形で表現する方法(図2(a))とボロノイ図を用いて描く方法(図2(b))とがある(Meineke *et al.*, 2001)。この図を用いて動画を作成することもでき、細胞の動的な挙動を可視化することに成功した。

・実験データの再現

次にシミュレーション結果の妥当性を検討するため、実験データとして入手可能な Labeling Index (LI) を計算する。LIとは、分裂期にある細胞が BrdU(ブロモデオキシウリジン)染色できることを利用して、袋状の陰窩の横一列に BrdU 染色された細胞すなわち分裂期にある細胞が存在する割合を、陰窩底部からの細胞位置(cell position)の関数として算出したものである。シミュレーションにおいては、まず図2のような細胞配置パターンを表示し、モデルの底辺から 10 μ m ずつに cell position を区切り、1つの position に存在する分裂期にある細胞の割合から LI を算出した。

実験データの LI を再現するに当たって、まずシミュレータのパラメータ設定により LI プロットがどのように変化するかを調べた。その結果を図3に示す。非対称分裂の確率を変化させた場合(図3(a))、確率を増加させるとプロットの尾部(Cell Position の高い部分)が上昇する傾向が見られた。成熟細胞になるまでの分裂回数を変化させた場合(図3(b))、2回から5回まで変化させるにつれて、プロットのエリア面積が拡大する傾向が見られた。アポトーシスを起こす確率を変化させた場合(図3(c))、確率を増加させるとプロットが左下方方向に縮小する傾向が見られた。G0期に入り休眠する確率を変化させた場合(図3(d))、確率を増加させ

るとプロットの頂点が低下する傾向が見られた。なお、分裂軸の角度を変化させた場合に関してはLIプロットの変化は見られなかった。このことから、少なくともモデル化を行った部分（陰窩の下部を除いた部分）においては、分裂軸の制御はLIの空間パターンに影響を与えないことがわかる。

図3によって、どのパラメータを動かせばLIプロットをどちらの方向に動かせるかがわかる。この結果を用いて実験データLI(Potten *et al.*, 1992)へのチューニングを行った(図4)。その結果、実験データを再現するモデルにおける各パラメータは、非対称分裂を選択する確率が30%、成熟細胞になるまでの分裂回数が4回、アポトーシスを起こす確率が15%、G0期に入る確率が0%、そして分裂軸の角度が0 [rad] から π [rad] の間で無作為に選択、であった。G0期に入る確率を0%としても実験データを再現することができたことから、少なくともLIプロットへの影響という点においては、G0期に入る確率は考慮しなくてもよいと考えられる。

従来のモデル(Loeffler *et al.*, (1986); Boman *et al.*, (2008) など)では数多くの複雑な仮定を設定して陰窩をモデル化してきたが、本研究の結果によって、数少ない単純な仮定でも陰窩の細胞配置を再現できることがわかった。陰窩における細胞配置のダイナミクスは、これまで述べられてきたものよりも単純なものであることが示唆される。

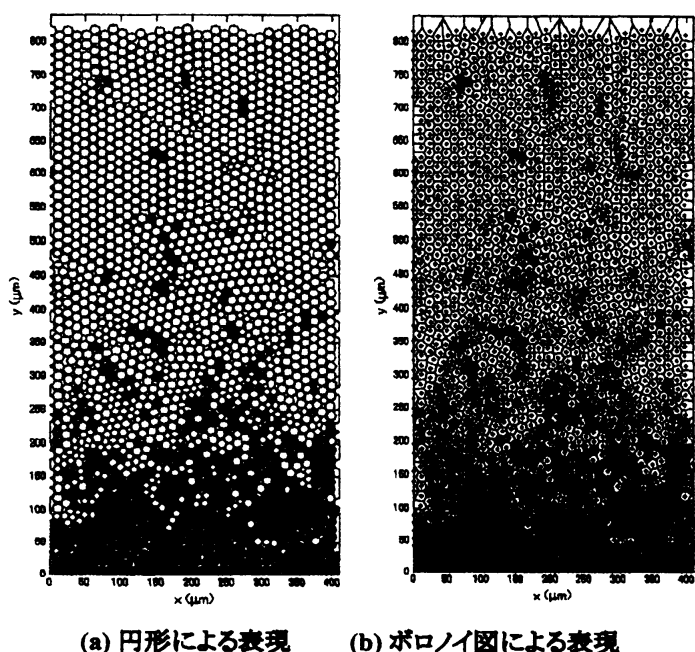


図2. 細胞配置の時空間パターンの可視化。(a) 1個の細胞を円形で表現する方法。白色の円形が成熟細胞、灰色の円形が分裂細胞を表す。陰窩の下1/3に分裂細胞が多く存在するという実験事実を反映した細胞パターンとなっている。最下部の黒色の円形は分裂細胞を生み出し続ける特殊な設定の細胞を表現しているが、この細胞群はLabeling Indexの計算(後述)には含まない。(b) 1個の細胞をボロノイ図により表現する方法。白色が成熟細胞、灰色が分裂細胞。黒色部分(最下部)の設定についても(a)と同じ。細胞間に空隙がなく、個々の細胞を多角形で表現するため、より現実に近いものとなっている。

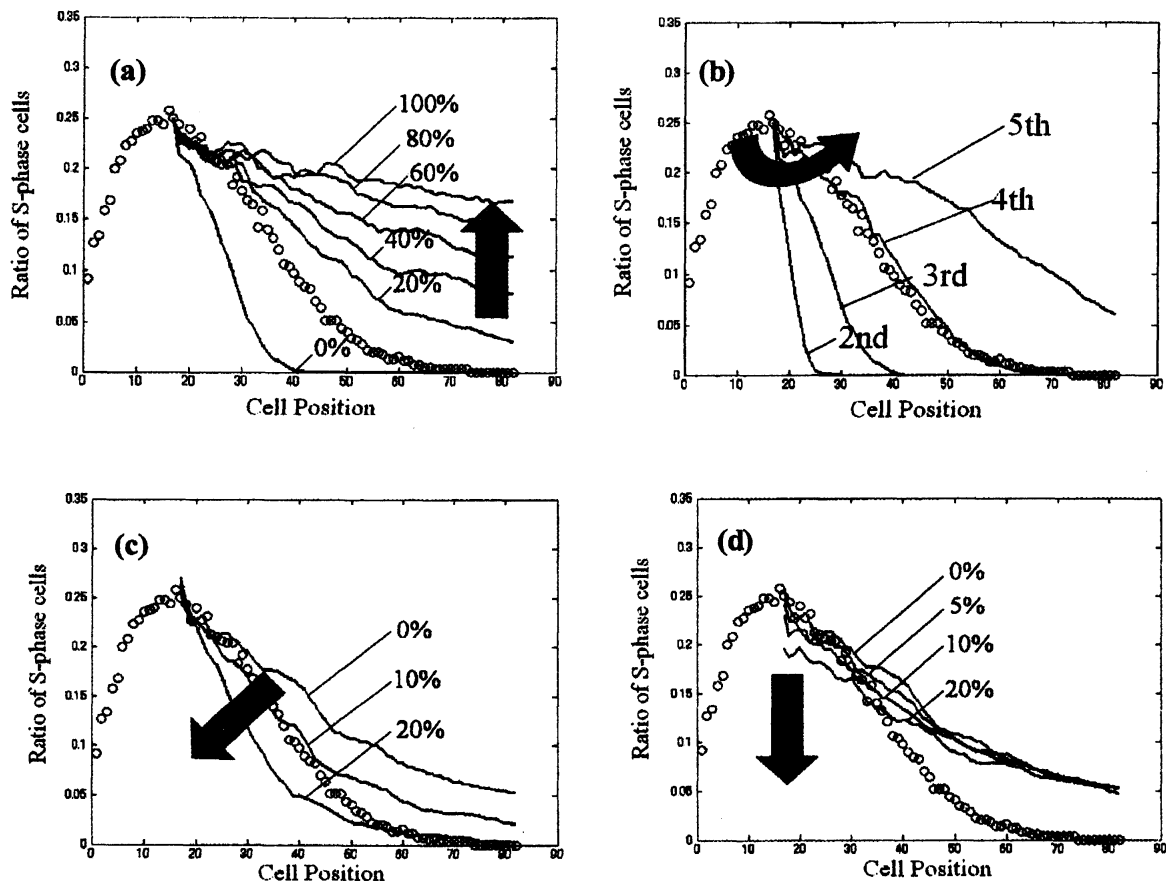


図3. 各パラメータの設定とLIプロットの変化. (a) 非対称分裂の確率を変化させた場合. (b) 成熟細胞になるまでの分裂回数を変化させた場合. (c) アポトーシスを起こす確率を変化させた場合. (d) G0期に入る確率を変化させた場合. 図中のプロットは実験データ(Potten *et al.*, 1992)を, 実線は本数理モデルによる結果を示す. 実線に関連付けられているラベルは各パラメータの設定値を表す. 矢印はパラメータ値を増加させたときのLIプロットの挙動を示している.

・細胞配置の可視化図の応用

個々の細胞に異なる設定ができるIBMの特徴を利用して, 特定の1個の細胞に遺伝子変異が起きたと仮定し, そのクローンを追跡するシミュレーション実験を行うことができる. 図5に一例を示す.

本研究では大腸モデルを仮定しているが, モデルサイズや細胞数を変更することで容易に小腸モデルを構築することができる. これを利用して, 大腸の場合のみに変異細胞のクローンが陰窩に広がる条件を解明することができれば, 「なぜ大腸はがん化しやすく, 小腸はがん化しにくいのか」という疑問に立ち向かえる可能性がある.

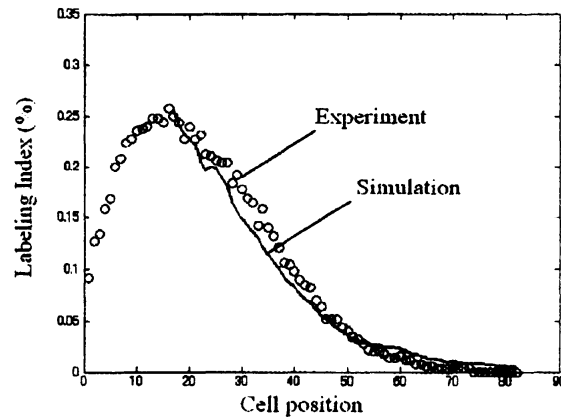


図 4. 実験データの再現. プロットは実験(Potten *et al.*, 1992) による LI を, 実線は本数理モデルによる LI をそれぞれ示している. モデルにおける各パラメータは, 1. 非対称分裂を選択する確率:30%, 2. 成熟細胞になるまでの分裂回数:4 回, 3. アポトーシスを起こす確率:15%, 4. G0 期に入る確率:0%, 5. 分裂軸の角度:0[rad] から π [rad] の間で無作為に選択, とした. またモデルでは, 細胞配置の時空間パターン(図 2)の Cell Position 17 以上の部分を用いて LI を計算した.

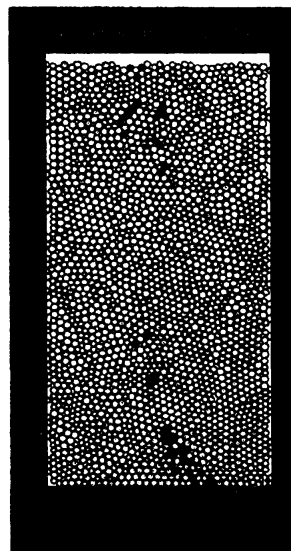


図 5. 遺伝子変異のクローン追跡の一例. Cell Position 1 に存在する細胞を 1 個だけ黒くし, その細胞の子孫がすべて黒色になるという設定で計算を進めると, 黒色の細胞すなわち最初に黒くした細胞のクローンが陰窩上部に向かって広がっていく様子を可視化できる.

【結言】

- ・陰窩細胞の増殖分化シミュレータの基盤となる数理モデルを構築した.
- ・本モデルを用いて, 細胞増殖分化の時空間パターンを可視化し, 実験データを再現することができた.

【参考文献】

- B.M. Boman, J.Z. Fields, K.L. Cavanaugh, A. Guetter, and O.A. Runquist. How Dysregulated Colonic Dynamics Cause Stem Cell Overpopulation and Initiate Colon Cancer. *Cancer Res.*, 2008.
- M. Loeffler, R. Stein, H.E. Wichmann, C.S. Potten, P. Kaur, and S. Chwalinski. Intestinal cell proliferation. I. A comprehensive model of steady-state proliferation in the crypt. *Cell Tissue Kinet.*, 1986.
- F.A. Meineke, C.S. Potten, and M. Loeffler. Cell migration and organization in the intestinal crypt using a lattice-free model. *Cell Prolif.*, 2001.
- C.S. Potten, M. Kellett, S.A. Roberts, D.A. Rew, and G.D. Wilson. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine, *Gut*, 1992.